

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-315597

(43)Date of publication of application : 29.10.2002

(51)Int.Cl.

C12P 41/00
//(C12P 41/00
C12R 1:01)
(C12P 41/00
C12R 1:38)

(21)Application number : 2001-125635

(71)Applicant : MITSUBISHI GAS CHEM CO INC

(22)Date of filing : 24.04.2001

(72)Inventor : DOTANI MASAHARU
KONDO TOSHIO

(54) METHOD FOR MANUFACTURING OPTICALLY ACTIVE ALPHA-AMINO ACID

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an industrial method for manufacturing an optically active D- or L- α -amino acid by using D,L- α -amino acid amide.

SOLUTION: D,L- α -amino acid amide is hydrolyzed through a biochemical asymmetric hydrolysis using microbial cell bodies such as Mycoplasma bullata, Mycoplasma dimorpha, Rhodococcus erythropolis or Pseudomonas rosea or the like immobilized with a resin produced from a monomer of an acrylic acid ester, a methacrylic acid ester or a urethane acrylate.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-315597

(P2002-315597A)

(43) 公開日 平成14年10月29日 (2002. 10. 29)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	7-コード* (参考)
C 1 2 P 41/00		C 1 2 P 41/00	A 4 B 0 6 4
// (C 1 2 P 41/00		C 1 2 R 1: 01	
C 1 2 R 1: 01)		1: 38	
(C 1 2 P 41/00			
C 1 2 R 1: 38)			
審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 9 頁)			

(21) 出願番号 特願2001-125635(P2001-125635)

(22) 出願日 平成13年4月24日 (2001. 4. 24)

(71) 出願人 000004466

三菱瓦斯化学株式会社

東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

(72) 発明者 鈴木 正晴

新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱

瓦斯化学株式会社新潟研究所内

(72) 発明者 近藤 俊夫

新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱

瓦斯化学株式会社新潟研究所内

Fターム(参考) 4B064 AE03 AE05 AE06 CA02 CA35

CA38 CB06 CC01 CD12 CD27

(54) 【発明の名称】 光学活性 α -アミノ酸類の製造方法

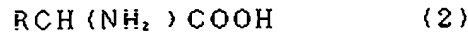
(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 D、L- α -アミノ酸アミドを用いて光学活性D-またはL- α -アミノ酸の工業的に製造する方法を提供する。

【解決手段】 アクリル酸エステル類、メタクリル酸エステル類またはウレタンアクリレート類をモノマーとした樹脂により固定化した、ミコプラナ・プラタ、ミコプラナ・ジモルファ、ロドコッカス・エリスロポリス、シュドモナス・ロゼア等の菌体を用いて、D、L- α -アミノ酸アミド類を生化学的不斉加水分解する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アクリル酸エステル類、メタクリル酸エステル類またはウレタンアクリレート類をモノマーとした樹脂により固定化した菌体を用いて、一般式(1)で表されるD、L- α -アミノ酸アミド類を生化学的不斉加水分解し、一般式(2)で表される光学活性 α -アミノ酸類を製造することを特徴とする光学活性 α -アミノ酸類の製造方法。



(Rは低級アルキル基、置換低級アルキル基、シクロヘキシル基、置換シクロヘキシル基、フェニル基、置換フェニル基、ベンジル基、置換ベンジル基、複素環基および置換複素環基である。)

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は光学活性 α -アミノ酸類の製造方法に関する。更に詳しくは固定化菌体を用いてD、L- α -アミノ酸アミド類を生化学的に不斉加水分解して対応するL-またはD- α -アミノ酸類を製造する方法に関する。光学活性 α -アミノ酸類は、各種工業薬品などの中間体ならびに、医薬、化粧品、飼料添加物、食品添加物および医薬品として重要な物質である。

【0002】

【従来の技術】 α -アミノ酸アミドを生化学的に加水分解して、光学活性 α -アミノ酸を製造する方法は公知である。例えば、D、L- α -アミノ酸アミドにシゾサッカロミセス属、ロドスピリジウム属、キャンディタ属、クリプトコッカス属、ピチロスポラム属、ロドトルラ属、トルロブシス属、トリコスボロン属またはトレメタ属に属しL- α -アミノ酸アミド加水分解活性を有する微生物の培養液、生菌体あるいは菌体処理物を作用させ、対応するL- α -アミノ酸を製造する方法(特開昭59-159789)、D、L- α -アミノ酸アミドにロドスピリラム属、ロドシュードモナス属、スピリラム属、マイクロシクラス属、シュードモナス属、グルコノバクター属、アグロバクテリウム属、アルカリゲネス属、アクロモバクター属、アセトバクター属、エッシェリヒア属、エントロバクター属、セラチア属、アエロモナス属、フラボバクテリウム属、パラコッカス属、チオバチラス属、ストレプトコッカス属、コリネバクテリウム属、アルスロバクター属、マイクロバクテリウム属、ノカルジア属、ムコール属、リゾプス属、アスペルギラス属、ペニシリウム属、フサリウム属、ナドソニア属、ハンセンシアスポラ属、ウイゲルハミア属、サッカロマイセス属、ロッデロマイセス属、ピチア属、ハンセンラ属、パチソレン属、シテロマイセス属、デバリオマイセス属、デッケラ属、サッカロマイコブシス属、リボマイセス属、ロイコスピリジウム属、スピロバロマイセス属、

スピリジオボラス属、オオスピリジウム属、ステリグマトマイセス属、またはトリコノブシス属に属し、L- α -アミノ酸アミド加水分解活性を有する微生物の培養液、生菌体あるいは菌体処理物を作用させ、対応するL- α -アミノ酸を製造する方法(特開昭60-36446)、D、L- α -アミノ酸アミドにミコプラナ属またはプロタミノバクター属に属し、L- α -アミノ酸アミド加水分解活性を有する微生物の菌体あるいは菌体処理物を作用させ、対応するL- α -アミノ酸を製造する方法(特開平01-277499)、D、L- α -アミノ酸アミドにミコバクテリウム、メタノリカ属に属しL- α -アミノ酸アミド加水分解活性を有する微生物の菌体あるいは菌体処理物を作用させ、対応するL- α -アミノ酸を製造する方法(特開平01-215297)、D- α -アミノ酸アミドにアクロモバクター属、アルカリゲネス属またはクルチア属に属しD- α -アミノ酸アミド加水分解活性を有する微生物の培養液、生菌体あるいは菌体処理物を作用させ、対応するD- α -アミノ酸を製造する方法(特開昭60-184392)、D- α -アミノ酸アミドにシュードモナス属、ロドコッカス属またはセラチア属に属しD- α -アミノ酸アミド加水分解活性を有する微生物の培養液、生菌体あるいは菌体処理物を作用させ、対応するD- α -アミノ酸を製造する方法(特開昭61-274690)、D、L- α -アミノ酸アミドにロドコッカス属に属しD- α -アミノ酸アミドを選択的に加水分解活性を有する微生物の培養液、生菌体あるいは菌体処理物を作用させ、対応するD- α -アミノ酸を製造する方法(特開昭63-087998)、などが知られている。これら、従来の方法は、いずれも α -アミノ酸アミド含有水溶液へ微生物の培養液、生菌体あるいは菌体処理物を添加することによって行われる。

【0003】

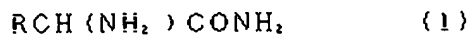
【発明が解決しようとする課題】従来、 α -アミノ酸アミド含有水溶液へ菌体あるいは菌体処理物を添加して反応させる場合、菌体が高価であることから、反応生成液から菌体あるいは菌体処理物を回収して、次の反応で再使用する必要がある。しかしながら、菌体あるいは凍結乾燥菌体のような菌体処理物を懸濁系で使用した場合には菌体膜の損傷による酵素の溶出により回収菌体の酵素活性は著しく低下したり、個々の細胞が微小であるため回収困難といった問題があった。これらを解決するために、固定化菌体の使用が考えられるが、これまでに、D、L- α -アミノ酸アミドの生化学的不斉加水分解反応で使用されている具体的な報告は認められない。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、固定化菌体を用いてD、L- α -アミノ酸アミド類を生化学的に不斉加水分解して光学活性 α -アミノ酸類を製造する方法について鋭意検討を行った結果、固定化するための樹

脂のモノマー（以下、固定化担体モノマーと称す）として、アクリル酸エステル類、メタクリル酸エステル類又はウレタンアクリレート類を用いることにより担体の崩壊および膨潤なく長時間安定した酵素活性が得られることを見出し、本発明に到達した。

【0005】即ち、本発明はアクリル酸エステル類、メタクリル酸エステル類またはウレタンアクリレート類をモノマーとした樹脂により固定化した菌体を用いて、一般式（1）で表されるD、L- α -アミノ酸アミド類を生化学的不斉加水分解し、一般式（2）で表される光学活性 α -アミノ酸類を製造する光学活性 α -アミノ酸類の製造方法に関する。



（Rは低級アルキル基、置換低級アルキル基、シクロヘキシル基、置換シクロヘキシル基、フェニル基、置換フェニル基、ベンジル基、置換ベンジル基、複素環基および置換複素環基である。）

【0006】

【発明の実施の形態】本発明の方法は通常、固定化担体モノマー、架橋剤、重合促進剤および菌体を含有した液へ重合開始剤を添加し、重合させることにより固定化菌体を得、これを成形後、塔に充填し、D、L- α -アミノ酸アミド含有水溶液と固定化菌体とを接触させることにより行われる。

【0007】本発明で示される固定化担体モノマーの中のアクリル酸エステル類としては、例えばノニルフェノキシポリエチレングリコールアクリレート、ノニルフェノキシポリプロピレングリコールアクリレート、シリコン変性アクリレート、ポリプロピレングリコールモノアクリレート、フェノキシエチルアクリレート、フェノキシジエチレングリコールアクリレート、フェノキシポリエチレングリコールアクリレート、メトキシポリエチレングリコールアクリレート、アクリロイルオキシエチルハイドロジェンサクシネート、ラウリルアクリレート、エトキシ化ネオペンチルグリコールジアクリレート、プロポキシ化ネオペンチルグリコールジアクリレート、ポリエチレングリコールジアクリレート、1、6-ヘキサジオールジアクリレート、ネオペンチルグリコールジアクリレート、トリプロピレングリコールジアクリレート、ポリプロピレングリコールジアクリレート、2、2-ビス（4-アクリロキシエトキシフェニル）プロパン、2-ヒドロキシ-1-アクリロキシ-3-メタクリロキシプロパン、エトキシ化トリメチロールプロパントリアクリレート、プロポキシ化トリメチロールプロパントリアクリレート、エトキシ化ペンタエリスリトールテトラアクリレート、プロポキシ化ペンタエリスリトールテトラアクリレート、ジトリメチロールプロパントテトラアクリレート等。

【0008】メタクリル酸エステル類としては、例えば

1、3-ブチレングリコールジメタクリレート、1、4-ブタンジオールジメタクリレート、エチレングリコールジメタクリレート、ジエチレングリコールジメタクリレート、トリエチレングリコールジメタクリレート、ポリプロピレングリコールモノメタクリレート、ポリエチレングリコールジメタクリレート、ブチレングリコールジメタクリレート、ヘキサジオールジメタクリレート、ネオペンチルグリコールジメタクリレート、ポリブレングリコールモノメタクリレート、ポリブレングリコールジメタクリレート、2-ヒドロキシ-1、3-ジメタクリロキシプロパン、2、2-ビス（4-メタクリロキシエトキシフェニル）プロパン、2、2-ビス（4-メタクリロキシジエトキシフェニル）プロパン、2、2-ビス（4-メタクリロキシポリエトキシフェニル）プロパン、トリメチロールプロパントリメタクリレート、メトキシジエチレングリコールメタクリレート、メトキシポリエチレングリコールメタクリレート、メタクリロイルオキシエチルハイドロジェンフタレート、メタクリロイルオキシエチルハイドロジェンサクシネート、3-クロロ-2-ヒドロキシプロピルメタクリレート、ステアрилメタクリレート、2-ヒドロキシメタクリレート、エチルメタクリレート等、ウレタンアクリレート類としてはウレタンアクリレート、ウレタンジメチルアクリレート、ウレタントリメチルアクリレートが挙げられる。

【0009】架橋剤としては、例えば、N、N'-メチレンビスアクリルアミド、N、N'-プロピレンビスアクリルアミド、ジアクリルアミドジメチルエステル等である。また、重合促進剤としては、例えば、 β -ジメチルアミノプロピオニトリル、N、N、N'、N'-テトラメチルエチレンジアミン等である。重合開始剤としては、通常過硫酸カリウムが使用される。

【0010】本発明の固定化菌体製造に使用される微生物は、D、L- α -アミノ酸アミド類を不斉加水分解し、対応する光学活性 α -アミノ酸を生成する活性を有するものであれば、特に限定されるものではない。微生物の培養は、使用微生物が通常資化し得る炭素源、窒素源、各微生物に必須の無機塩、栄養等を含有させた培地を用いて行われるが、高い酵素活性を得るために培地へ予めD、L- α -アミノ酸アミドを添加することも効果的である。この際に使用されるD、L- α -アミノ酸アミドは、目的とする光学活性 α -アミノ酸に対応するD、L- α -アミノ酸アミドであることが好ましいが、他の α -アミノ酸アミドでも良い。培養時のpHは4～10の範囲であり、温度は20～50℃である。培養は1日～1週間好気的に行われる。このようにして培養した微生物は培養液、濃縮菌体あるいは湿菌体として固定化菌体の製造に使用される。固定化菌体以下のように製造される。固定化担体モノマー濃度10～25wt%、架橋剤濃度0.3～3wt%、重合促進剤濃度0.1～2wt%、菌体濃度（乾燥菌体として）1～15wt%

%, 重合開始濃度0.1~1wt%とした溶液を温度10~50℃の範囲に保つことにより重合をおこなわせる。このようにして製造した固定化菌体は適当な大きさに成型後、塔に充填し、D、L- α -アミノ酸アミドの生化学的不斉加水分解反応に使用される。

【0011】本発明の一般式(1)で示される α -アミノ酸アミド類のRの低級アルキル基には特に制限はないが、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチルおよびt-ブチルなどのC₁~C₄の直鎖または分岐した低級アルキル基であり、複素環基としては、フリル基、ピリジル基、チアゾリル基、イミダゾリル基およびインドリル基であり、また、置換低級アルキル基、置換シクロヘキシル基、置換フェニル基、置換ベンジル基および置換複素環基のそれぞれに含まれる置換基は、例えばヒドロキシ、メトキシ、メルカプト、メチルメルカプト、アセタール、カルボキシル、カルボキサミド、ハロゲン、イミダゾリルおよびインドリルなどである。一般式(1)で表される α -アミノ酸アミド類の代表例としては、グリシンアミド、アラニンアミド、2-アミノ酪酸アミド、バリンアミド、ロイシンアミド、イソロイシンアミド、t-ロイシンアミド、セリンアミド、スレオニンアミド、システインアミド、シスチンアミド、メチオニンアミド、アスパラギンアミド、グルタミンアミド、フェニルグリニンアミド、フェニルアラニンアミド、チロシンアミド、トリプトファンアミドおよびヒスチジンアミドなどが挙げられる。

【0012】また、本発明の一般式(2)で示される光*

培地組成:	グルコース	7g
	ポリペプトン	3.5g
	酵母エキス	3.5g
	KH ₂ PO ₄	1.4g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.28g
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01g
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.01g
	蒸留水	700mL
	pH	7

培養終了時、培養液の菌体濃度は0.52wt%であった。この培養液250mlから遠心分離により5.4gの生菌体を得た。

【0014】(2) 固定化菌体の調製

ポリエチレングリコール1000-ジメタクリレート5.4g、N、N'-メチレンビスアクリルアミド0.30gを100mLビーカーに秤取り、水10mLを加え溶解後、 β -ジメチルアミノプロピオニトリル0.15gを添加、次いで(1)で得た生菌体全量を加え良く混合した。この菌懸濁スラリーへ、2.5wt%過硫酸カリウム3gを添加し、煮早く混合後1時間放冷し、次いで3~4mm角に裁断し固定化菌体成型品を得た。

* 光学活性 α -アミノ酸類は、上記 α -アミノ酸アミド類に対応した光学活性 α -アミノ酸類である。使用原料である α -アミノ酸アミド類含有水溶液中の α -アミノ酸アミド濃度は、特に限定されるものではないが、通常は10~50重量%である。固定化菌体充填塔を用いたD、L- α -アミノ酸アミドの生化学的不斉加水分解反応は、通常、固定化菌体を充填した多段塔へD、L- α -アミノ酸アミド水溶液を連続的に供給することにより行われる。D、L- α -アミノ酸アミドの供給速度は、菌の保有する酵素活性の強さ、固定化菌体中の菌体濃度等により一概に言えないが0.1~10g/dry cell · hrであり、反応温度は20~70℃、反応pH5~13の範囲である。D、L- α -アミノ酸アミドの生化学的不斉加水分解反応で生成したL-またはD- α -アミノ酸は、反応生成液からイオン交換膜透析による分離後、濃縮晶出、あるいは減圧濃縮後アルコール類を加えてL-またはD- α -アミノ酸を析出させ濾取するなどの方法により容易に分離することができる。

【0013】

【実施例】以下に実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこの実施例により限定されるものではない。

実施例1

(1) 使用菌の培養

次の組成の培地を調製し、この培地250mLを1L三角フラスコに入れ、滅菌後、ミコプラナ プラタ(Mycoplasma pullata) NCIB9440を接種し、30℃で48時間振とう培養を行った。

	7g
	3.5g
	3.5g
	1.4g
	0.28g
	0.01g
	0.01g
	700mL
	7

【0015】(3) 酵素反応

第一反応塔と第二反応塔とを直列に連結した装置(図1)を用いて連続加水分解反応を行った。その際原料溶液を第一反応塔に供給し、生成物溶液を第二反応塔より抜き出す。また第一反応塔では反応液を塔内で循環し、第二反応塔では塔内で循環しない。第一反応塔および第二反応塔のそれぞれに(2)で得られた固定化菌体成型品を1/2ずつ充填した。原料溶液は20wt%D、L-ロイシンアミド水溶液(MnCl₂ 1000 μ M/L添加)であり、原料溶液の第一反応塔への供給速度は6g/hrで行った。第一反応塔内での反応液循環量は600g/hrとした。第一反応塔内および第二反応塔内での反応温度は何れも30℃とした。第一反応塔内お

よび第二反応塔内での滞留時間は何れも4時間とした。*なお、原料アミドの加水分解率は以下の式に基づき算出結果を表1に示す。表1からわかるように、3000時間経過しても酵素活性の低下は殆ど認められなかった。*

$$\text{加水分解率 (\%)} = \frac{(\text{生成光学活性アミノ酸のモル数}) \times 2}{(\text{原料D, L-アミノ酸アミドのモル数})} \times 100$$

【0016】

表1

経過時間 (h r)	D,L-ロイシンアミド加水分解率 (%)		L-ロイシン蓄積生産量 (g/g dry cell)
	第一反応塔	第二反応塔	
100	40	49	45
500	38	49	227
1000	39	49	448
1500	39	50	678
2000	39	49	907
2500	39	49	1132
3000	39	49	1351

【0017】実施例2

(1) 使用菌の培養

使用菌としてミコプラナ ジモルファ (*Mycoplasma dimorpha*) iFO 13291を使用し、培地へD,L- α -ロイシンアミド3.5gを添加した以外は実施例1と同様にして培養を行った。培養終了時、培養液の菌体濃度は0.54wt%であった。この培養液250mlから遠心分離により5.3gの生菌体を得た。

【0018】(2) 固定化菌体の調製

メトキシポリエチレングリコール400-アクリレート 5.4g、ジアクリルアミドジメチルエステル 0.30gを100mlビーカーに秤取し、水10mlを加え溶解後、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン 0.15gを添加、次いで(1)で得た生菌体全量を加え良く混合した。この菌懸濁スラリーへ2.5wt%過硫酸カリウム 3gを添加し、素早く混合後※

※1時間放冷し、次いで3~4mm角に裁断し固定化菌体成型品を得た。

【0019】(3) 酵素反応

実施例1と同様な装置を使用し、各塔に(2)で得られた固定化菌体成型品を1/2ずつ充填し、下記反応条件でD,L- α -ロイシンアミドの連続加水分解反応を行った。原料溶液は15wt%D,L- α -ロイシンアミド水溶液 (MnCl₂ 1000μM/L添加)であり、原料溶液の第一反応塔への供給速度は2g/hrで行った。第一反応塔内での反応液循環量は600g/hrとした。第一反応塔内および第二反応塔内での反応温度は何れも45℃とした。第一反応塔内および第二反応塔内での滞留時間は何れも12時間とした。実験結果を表2に示す。表2からわかるように、2000時間経過しても酵素活性の低下は殆ど認められなかった。

【0020】

表2

経過時間 (h r)	D,L- α -ロイシンアミド加水分解率 (%)		L- α -ロイシン蓄積 生産量 (g/g dry cell)
	第一反応塔	第二反応塔	
100	35	46	14
500	35	47	70
1000	35	46	138
1500	35	46	208
2000	35	46	280

【0021】実施例3

(1) 使用菌の培養

使用菌として、ロドコッカス エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*) FER m-8938を使用した以外は実施例1と同様にして培養を行った。培養終了時、培養液の菌体濃度は0.57wt%であった。この培養液250mlから遠心分離により5.6gの生菌体を得た。

【0022】(2) 固定化菌体の調製

ウレタンアクリレート 5.4g、N,N'-メチレンビスアクリルアミド 0.3gを100mlビーカーに秤取し、水10mlを加え溶解後、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン 0.15gを添加、次いで(1)で得た生菌体全量を加え良く混合した。この菌懸濁スラリーへ2.5wt%過硫酸カリウムを添加し、素早く混合後1時間放冷し、次いで3~4mm角に

裁断し、固定化菌体成型品を得た。

【0023】(3) 酵素反応

実施例1と同様な装置を使用し、各塔に(2)で得られた固定化菌体成型品を1/2置つつ充填し、下記反応条件でDL-バリンアミドの連続加水分解反応を行った。原料溶液は20wt%D、L-バリンアミド水溶液(エチレンジアミン-N, N, N', N'-四酢酸10⁻³M/L添加)であり、原料溶液の第一反応塔への供給速度*

*は8g/hrで行った。第一反応塔内での反応液循環量は600g/hrとした。第一反応塔内および第二反応塔内での反応温度は何れも40℃とした。第一反応塔内および第二反応塔内での滞留時間は何れも3時間とした。結果を表3に示す。表3からわかるように、3000時間経過しても酵素活性の低下は殆ど認められなかった。

【0024】

表3

経過時間 (hr)	D,L-バリンアミド加水分解率(%)		D-バリン蓄積生産量 (g/g dry cell)
	第一反応塔	第二反応塔	
100	39	49	79
500	39	49	396
1000	39	49	789
1500	39	49	1182
2000	39	49	1574
2500	38	49	1970
3000	39	49	2362

【0025】実施例4

(1) 使用菌の培養

グルコース1.0wt%, ポリペプトン1.0wt%および酵母エキス1.0wt%を含有する種培地を調製し、この種培地30mLを100mL三角フラスコに入*

※れ、滅菌後、種菌としてシェードモナス ロゼア(Pseudomonas rosea) NCIB 10605を接種し、30℃で48時間振とう培養を行い種培養液を得た。この種培養液を次の組成の本培地2Lに移植し、30℃で48時間通気攪拌培養を行った。

本培地組成 :	グルコース	1.0g
	ポリペプトン	0.5g
	酵母エキス	0.5g
	KH ₂ PO ₄	0.1g
	MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.04g
	FeSO ₄ ・7H ₂ O	0.001g
	MnCl ₂ ・4H ₂ O	0.001g
	DL-バリンアミド	0.5g
	pH	7

培養終了時、培養液の菌体濃度は0.51wt%であった。この培養液2Lから遠心分離により42.4gの生菌体を得た。

【0026】(2) 固定化菌体の調製

(1)で得た生菌体4gを使用した以外は実施例1と同様にして固定化菌体成型品を得た。

【0027】(3) 酵素反応

実施例1と同様な装置を使用し、各塔に(2)で得られた固定化菌体成型品を1/2置つつ充填し、下記反応条件でDL-バリンアミドの連続加水分解反応を行った。★

★原料溶液は20wt%D、L-バリンアミド水溶液(MnCl₂ 1000μM/L添加)であり、原料溶液の第一反応塔への供給速度は6g/hrで行った。第一反応塔内での反応液循環量は600g/hrとした。第一反応塔内および第二反応塔内での反応温度は何れも40℃とした。第一反応塔内および第二反応塔内での滞留時間は何れも4時間とした。結果を表4に示す。表4からわかるように、3000時間経過しても酵素活性の低下は殆ど認められなかった。

【0028】

表4

経過時間 (hr)	D,L-バリンアミド加水分解率(%)		L-バリン蓄積生産量 (g/g dry cell)
	第一反応塔	第二反応塔	
100	43	50	62
500	41	50	310
1000	41	50	620
1500	41	50	935
2000	41	50	1247

(2)

11			12		
2500	41	50	1560		
3000	41	50	1871		

【0029】比較例1

(1) 固定化菌体の調製

アルギン酸ソーダー 0.75gを100mLビーカーに秤取りし、水23mLを加え40℃加温溶解後、実施例4(1)で得られた生菌体4.5gを加え良く混合した。この菌懸濁液を注射器を用いて、5℃に冷却した2%塩化カルシウム溶液250mL中へ滴下、そのまま2時間ゆっくり攪拌し、3~5mmφの粒状固定化菌体を得た。

【0030】(2) 酵素反応

実施例4と同様にしてD,L-バリンアミドの連続加水分解反応を行った。結果を表5に示す。その結果、単体の膨潤が著しく、このために菌の漏出により酵素活性が低下、反応開始から230時間経過した時点で第一反応塔内固定化菌体がドロドロに崩壊した。

【0031】

表5

経過時間 (hr)	D,L-バリンアミド加水分解率(%)	
	第一反応塔	第二反応塔
50	33	50
100	21	38
150	18	32
200	18	31
230	-	-*

*第1塔固定化菌体がドロドロに崩壊

【0032】比較例2

(1) 固定化菌体の調製

実施例4(1)で得られた生菌体4gを100mLビーカーに秤取りし、生理食塩水10mLを加え懸濁後、アクリルアミドモノマー 2.8g、N,N'-メチレンビスアクリルアミド 0.15g、5%β-ジメチルアミノプロピオントリル 1.9mLを加え、良く混合溶解した。この菌懸濁液スラリーへ2.5%K₂S₂O₈ 1.5mLを添加し、混合後37℃で30分間放置し、室温まで冷却後3~4mm角に裁断し固定化菌体成型品を得た。

【0033】(2) 酵素反応

実施例4と同様にしてD,L-バリンアミドの連続加水分解反応を行った。実験結果を表6に示す。その結果、初期活性は比較例1のアルギン酸カルシウムを使用した場合より高かったが、経時的に単体の膨潤による酵素活性の低下が著しく、反応開始から350時間経過した時点で実験を中止した。

【0034】

表6

経過時間 (hr)	D,L-バリンアミド加水分解率(%)	
	第一反応塔	第二反応塔
50	43	50
100	39	49
150	35	46
200	33	43
250	30	39
300	24	37
350	19	33

【0035】比較例3

(1) 固定化菌体の調製

κ-カラギーナン 0.85gを100mLビーカーに秤取りし、水23mLを加え、40℃加温溶解後、実施例4(1)で得られた生菌体4gを加え良く混合した。この菌懸濁液を10℃で30分間冷却し固化後、0.3mol/L KCl溶液に1時間浸した後3~4mm角に成型した。別途調製した0.3mol/L KCl、0.05mol/L H₂PO₄溶液(pH7)10mLを5℃に冷却し、この中へ上記成型した固定化菌体を浸漬し10分間ゆるく攪拌後、0.1mol/Lグルタルアルデヒド4mLを添加し5℃で30分間攪拌し硬化処理を行った。硬化処理後、液を分離し、冷0.3mol/L KCl溶液で2時間洗浄し固定化菌体を得た。

【0036】(2) 酵素反応

実施例4と同様にしてD,L-バリンアミドの連続加水分解反応を行った。実験結果を表7に示す。その結果、ゲルの膨潤および酵素活性の低下は認められないが、固定化菌体調製時の活性低下が大きく、実施例4に示す本願発明に比較して著しく悪いことから反応開始から350時間経過した時点で実験を中止した。

【0037】

表7

経過時間 (hr)	D,L-バリンアミド加水分解率(%)	
	第一反応塔	第二反応塔
50	21	34
100	23	36
150	21	36
200	22	36
250	21	34
300	21	35
350	21	34

【0038】比較例4

(1) 固定化菌体の調製

ポリエチレングリコール(4000)1000重量部、ポリプロピレングリコール(4000)1000重量部、イソホロンジイソシアネート220重量部および

20

30

40

50

13

メタアクリル酸2-ヒドロキシエチル130重量部から得られた光硬化性樹脂8gおよびアルギン酸ナトリウム0.12gを100mLビーカーへ秤取し、水18mLを加え溶解後、ベンゾインイソブチルエーテル0.2gおよび実施例4(1)で得られた生菌体4gを加え良く混合した。この菌懸濁液を、注射器を用いて0.5mL/L塩化カルシウム溶液を入れたシャーレ中へ滴下し、径2〜3mmの粒状物を得た。次いで、波長365nmの紫外線を3分間照射し、固定化菌体を得た。

【0039】(2) 酵素反応

実施例4と同様にしてD,L-バリンアミドの連続加水分解反応を行った。実験結果を表8に示す。その結果、固定化菌体調製時の活性低下が大きく、初期活性が実施例4に示す本願発明に比較して著しく低いことから反応開始から100時間経過で実験を中止した。

【0040】

*

14

表8

経過時間 (hr)	D,L-バリンアミド加水分解率(%)	
	第一反応塔	第二反応塔
10	13	21
50	12	20
100	12	20

【0041】実施例5原料アミド濃度を10wt%とした以外は実施例4と同様にして、各種D,L-アミノ酸アミド(D,L-フェニルグリシンアミド、D,L-フェニルアラニンアミド、D,L-トリプトファンアミド)から対応するL-アミノ酸の連続加水分解反応を行った。その結果を表9〜11に示す。その結果、いずれのアミドについても、2000時間経過で酵素活性の低下は殆ど認められなかった。

【0042】

*

表9

経過時間 (hr)	D,L-フェニルグリシンアミド加水分解率(%)	
	第一反応塔	第二反応塔
100	39	49
500	39	49
1000	39	49
1500	39	49
2000	38	49

【0043】

表10

経過時間 (hr)	D,L-フェニルアラニンアミド加水分解率(%)	
	第一反応塔	第二反応塔
100	36	49
500	36	48
1000	36	49
1500	36	48
2000	36	48

【0044】

表11

経過時間 (hr)	D,L-トリプトファンアミド加水分解率(%)	
	第一反応塔	第二反応塔
100	39	50
500	39	50
1000	36	50
1500	36	50
2000	36	50

【0045】

【発明の効果】本発明の方法によって、比較的安価なD,L- α -アミノ酸アミド類から、光学活性D-またはL- α -アミノ酸類を容易に且つ効率良く製造することが可能となった。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1の連続加水分解反応で使用した反応装置の概略図を示す。

【符号の説明】

- 1 原料貯槽
- 2 天秤
- 3 供給ポンプ
- 4 循環ポンプ
- 5 第一反応塔
- 6 第二反応塔
- 7 反応液貯槽

【図1】

